Inmunología de la Oncocercosis

Luís Yarzábal (*)

7. RESUMEN

*La aplicación de los métodos y los conceptos de la inmunología al estudio de la oncocercosis ha provocado notables progresos en la comprensión de ciertos aspectos de las relaciones entre el agente causal (**0. volvulus**) y su hospedero definitivo natural (**Homo sapiens**).*

1. INTRODUCCION

La oncocercosis es una enfermedad parasitaria crónica causada por el nemátodo **Onchocerca volvulus** y transmitida por insectos dípteros del género **Simulium** (Railliet y Henry, 1910; Blacklock, 1926; Robles, 1919). Es endémica en las regiones intertropicales, habiendo sido encontrada en la mayoría de los países africanos, en Arabia Saudita y Yemen del Norte, y en seis países latinoamericanos: Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México y Venezuela (WHO, 1976; Moraes, Fraiha y Chaves, 1973; Little y D'Alessandro, 1970; Arzube y col., 1981; Robles, 1919; Hoffman, 1930; Potenza, Febres-Cordero y Anduze, 1949).

Se estima que a nivel mundial hay entre 20 y 40 millones de personas infectadas por **0. volvulus** y que existen 250 a 400 mil casos de ceguera causadas por esa infección (WHO, 1976; Janssens, 1981).

Aunque la enfermedad no es causa directa de muerte, origina intenso prurito, causa lesiones oculares incapacitantes, reduce significativamente la productividad en las poblaciones afectadas y provoca el abandono de tierras fértiles para la agricultura (Nelson, 1970).

Es una helmintiasis de distribución focal, que se encuentra en áreas adyacentes a corrientes de aguas rápidas donde los vectores tienen sus criaderos. El control de la enfermedad se basa en el tratamiento masivo de las pobla-

---

(*) Sección de Inmunología Parasitaria - CEPIALET OPS/OMS Instituto Nacional de Dermatología Caracas - Venezuela

ciones infectadas o en la lucha contra el vector mediante larvicidas como el DDT o el Abate (WHO, 1976; Nelson, 1981).

La quimioterapia masiva no se ha difundido como método de control porque las drogas existentes, dietilcarbamazina (DEC) y Suramina, pueden producir efectos colaterales severos, por lo que requieren estricta supervisión médica, lo que usualmente es imposible en las regiones endémicas (Nelson, 1981).

La lucha contra el vector mediante larvicidas químicos, aplicada por la Organización Mundial de la Salud desde 1974 en la cuenca del Alto Volta, tampoco es viable debido al elevadísimo costo del programa (WHO, 1976) y a eventuales repercusiones sobre los ecosistemas involucrados.

Esta situación, sumada a la multiplicación de observaciones clínicas y experimentales que sugieren la participación de mecanismos inmunológicos en la patogenia de la mayoría de las lesiones características de la oncocercosis, ha estimulado en la última década el estudio inmunológico de la enfermedad.

En esta comunicación procuraremos presentar los progresos más sobresalientes efectuados en el conocimiento de: a) la composición antigénica del agente causal, b) la respuesta inmunológica del huésped, c) los mecanismos inmunopatológicos y d) el diagnóstico inmunológico de la enfermedad.

2. ANTIGENICIDAD PARASITARIA

Cada uno de los estadios del ciclo evolutivo de **O. volvulus** produce numerosas poblaciones moleculares que se comportan como antígenos. Muchas de ellas son potentes inmunógenos que inducen respuestas inmunológicas tanto en el ser humano infectado como en animales inmunizados experimentalmente (Biguet y col. 1962). Para facilitar la exposición se examinarán esos estadios por separado.

2.1 Filarias adultas

2.1.1. Cortes histológicos

Debido a la falta de un modelo experimental viable, las fuentes de ejemplares adultos de **O. volvulus** han sido casi siempre oncocercomas extirpados quirúrgicamente de seres humanos. La antigenicidad se ha explorado sobre todo, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta practicadas

en cortes de material congelado (Ambroise-Thomas, 1974) o incluido en parafina (Collins & Skinner, 1979). De ese modo se ha revelado la presencia de múltiples determinantes antigénicos en la superficie externa y en el seno de la cutícula de las filarias.

2.1.2. Extractos solubles

Hasta 1977 este tipo de preparados se obtenía homogeneizando y centrifugando filarias extraídas de oncocercomas mediante disección (Biguet y col. 1962). El estudio inmunológico demostró en esos extractos tres tipos de antígenos: (a) específicos de **O. volvulus**, (b) comunes con otros parásitos, y (c) contaminantes provenientes del hospedero (Biguet y col., 1962; Neppert, 1974; Marcoullis, Salonen y Grasbeck, 1978). Los antígenos comunes son responsables de las reacciones inespecíficas causadas por extractos de **O. volvulus** al efectuar pruebas cutáneas y serológicas en individuos portadores de otras parasitosis. Entre los contaminantes de origen humano se han identificado la seroalbúmina y la IgG (Marcoullis, Salonen y Grasbeck, 1978). Actualmente es posible eliminar gran parte de los antígenos no específicos mediante el empleo de la técnica de digestión de los oncocercomas con colagenasa (Schulz-Key, Albiez y Buttner, 1977) y el uso de procedimientos inmunoquímicos de precipitación (Marcoullis, Salonen y Grasbeck, 1978). La digestión enzimática permite obtener gusanos con muy escasa cantidad de macromoléculas originarias del huésped, las cuales son extraídas mediante inmunoabsorción en fase fluida o por cromatografla de afinidad (Marcoullis, Salonen y Grasbeck, 1978). El análisis inmunoquímico de extractos solubles de cepas africanas de **0. volvulus** ha revelado en ellos numerosas sustancias inmunógerías y ha puesto de manifiesto diferencias antigénicas relacionadas con la localización geográfica del parásito. Briceson y col. (1976) observaron que la cepa de sabana del Camerún tiene un antígeno suplementario con respecto a la de selva, y apreciaron variaciones antigénicas entre gusanos adultos procedentes del mismo hospedero. En nuestros Laboratorios hemos analizado extractos solubles de filarias de dos demes del Alto Orinoco, revelando más de 70 polipéptidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Yarzábal y col., datos no publicados). La comparación de los electroforegramas de ambos demes (uno de sabana de altura y otro de bosque muy húmedo tropical) no demostró diferencias significativas. Cosa similar ocurrió con el isoelectroenfoque, el cual distribuyó los 70 polipéptidos entre los pH de 3.5 y 9.5. Sin embargo, la revelación de las actividades enzimáticas málicodeshidrogenasa (MDH) y glucosa fosfato isomerasa (GFI) reveló diferencias en los zimogramas correspondientes a la MDH. Es necesario proseguir estos estudios con el fin de conocer el papel que cumplen estas diversidades antigénicas en la patogenia de la oncocercosis.

2.1.3. Productos de excreción-secreción

Las filarias extraídas de oncocercomas mediante digestión enzimática, sobreviven por varios días en medios de cultivo libres de suero humano (Ambroise-Thomas y Daveau, 1981). Durante ese tiempo, como consecuencia del intercambio metabólico que establecen con su entorno, liberan productos de excreción-secreción que se acumulen en el medio. Varios autores han postulado que en los parásitos, estas sustancias son menos numerosas y más específicas que en los extractos solubles (Ishii, 1970; Fife, 1971). La evaluación de la reactividad serológica en ELISA de los sobrenadantes de cultivos de filarias adultas, apoya esta presunción, puesto que la prueba revela anticuerpos específicos en alto porcentaje de casos de oncocercosis y resulta negativa en otras helmintiasis (equinococosis, esquistosomiasis, estrongiloidiasis, toxocariasis, triquinosis) que habitualmente generan reacciones positivas falsas ante extractos solubles de **0. volvulus** (Ambroise-Thomas y Daveau, 1981). Estos resultados hacen aconsejable que se insista en la evaluación de los productos de excreción-secreción del estadio adulto de **O. volvulus** para el inmunodiagnóstico de la oncocercosis.

2.2. Microfilarias

2.2.1. Integras

Desde la década de los años 60 se han utilizado microfilarias de **O. volvulus** como reactivos antigénicos para pruebas de inmunofluorescencia indirecta (Lucasse, 1962). Este procedimiento ha permitido demostrar que las microfilarias poseen antígenos de superficie que interactúan con anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con oncocercosis. La técnica de anticuerpos fluorescentes ha revelado también que las microfilarias de piel tienen depósitos de IgG en su superficie, cosa que no ocurre con las microfilarias intrauterinas (Lucasse, 1962; Ngu y Blackett, 1976).

2.2.2. Extractos solubles

Los extractos antigénicos solubles se han preparado en general a partir de microfilarias extraídas del útero de hembras provenientes de oncocercomas y destruidas mecánicamente (Hashiguchi y col., 1979) o mediante ultra-sonicación (Ulrich, Pinardi y Convit, 1972). El análisis de la antigenicidad se ha hecho por medio de técnicas de hemaglutinación, de inmunoprecipitación y pruebas intradérmicas (Ulrich, Pinardi y Convit, 1972; Bryceson y col., 1976; Hashiguchi y col., 1979). Los electroforegramas en poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio revelan menor número de bandas en comparación con los extractos de adultos, pero muestran que las bandas mayores aparecen en iguales posiciones en ambos estadios (Bryceson y col., 1976). Los antígenos

microfilarianos solubles tienen escasa reactividad en reacciones serológicas (hemaglutinación e inmunoprecipitación) pero muestran alta sensibilidad (8586%) y aceptables índices de inespecificidad (7-13%) en pruebas intradérmicas (Ulrich, Pinardi y Convit, 1972; Bryceson y col., 1976; Hashiguchi y col., 1979).

2.2.3. Productos de excreción-secreción

Recientemente se ha observado que las microfilarias pueden sobrevivir in vitro en medios complejos (Schiller y col, 1979) y en medios químicamente definidos (Schiller y col., 1980), liberando en ellos productos de excreción-secreción que tienen propiedades antigénicas. Poco después, Ngu y col. (1981) idearon una técnica simple y muy eficiente para la recuperación de microfilarias a partir de nódulos. Este último procedimiento permitió comprobar que tanto el pH como la temperatura son factores muy importantes para la sobrevida in vitro de las microfilarias, y reveló que el subcultivo de éstas reduce su contaminación con proteínas del hospedero, llegando a valores mínimos después de 9 pases realizados en un período de 96 horas. El análisis inmunoquímico de los productos de excreción-secreción de microfilarias así tratadas, ha demostrado que generan 20 a 30 bandas polipeptídicas en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio revelados por autorradiografla (Ngu y col., 1981). Los mismos autores demostraron que después de absorción con inmunosueros anti-proteínas plasmáticas, el número de bandas se reduce a 10, mostrando 3 componentes mayores y 7 menores cuyas masas moleculares relativas varían entre 10.000 y 125.000. Varios de esos componentes resultaron ser inmunogénicos, y 4 de ellos produjeron bandas características en pruebas de inmunoprecipitación. Finalmente, de acuerdo con Ngu y col. (1981), el sobrenadante crudo del medio de cultivo de las microfilarias no contiene antígenos comunes con extractos solubles crudos de otros nemátodos **(Loa, loa, Onchocerca gutturosa, Litomosoides carinii, Dirofilaria inmitis y Ascaris lumbricoides)** y está libre del virus B de la hepatitis. Estos hallazgos obligan a insistir en la preparación de antígenos de excreción-secreción así como en la evaluación de su reactividad serológica y en el estudio de su papel como modulares de la respuesta inmunológica.

2.3. Larvas infectantes

Aún no se han publicado informes relacionados directamente con la composición antigénica de las larvas L3 de **O. volvulus.** Sin embargo algunos experimentos han revelado que los eosinófilos adhieren fuertemente a larvas L3 y han mostrado que la cutícula de éstas interacciona fuertemente con anticuerpos presentes en el suero de pacientes con oncocercosis (Henson, Macken-

zie y Spector, 1979). Este último fenómeno no ha sido confirmado en experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio (Allan y col., datos no publicados).

3. ANTIGENICIDAD DEL VECTOR

Durante la ingestión de sangre en el ser humano, los simúlidos vectores de la oncocercosis inyectan múltiples sustancias macromoleculares provenientes de sus glándulas salivares y de su tubo digestivo (Ramírez-Pérez, Yarzábal y Peterson, 1982). Algunas de esas sustancias se comportan como antígenos, provocando reacciones localizadas o generalizadas, de hipersensibilidad inmediata y estimulando la síntesis de diferentes clases de anticuerpos (Brown y Bernton, 1970; Lacey, 1981). Esta respuesta del hospedero puede dar lugar a broncoespasmo y dermatitis (Brown y Bernton, 1970), erupciones cutáneas (Lacey, 1981), y síndromes hemorrágicos (Noble y col, 1974; Pinheiro y col, 1974), siendo altamente probable que contribuya a la patogenia de algunas de las manifestaciones de la oncocercosis. Por otra parte, los antígenos del vector pueden asociarse con moléculas superficiales dé las larvas L3 de O. volvulus, interviniendo así en el estímulo antigénico inicial provocado por la forma infectante del parásito.

4. RESPUESTA INMUNOLOGICA DEL HOSPEDERO

La mayoría de las personas residentes en áreas donde la oncocercosis es endémica, son asintomáticas, aún cuando el examen parasitológico revele en ellas la presencia de microfilarias de 0. volvulus (Anderson y col., 1974). Entre aquellas que exhiben manifestaciones clínicas se han reconocido dos formas: (a) **la localizada**, que se limita a una de las extremidades y se caracteriza por prurito, oscurecimiento y engrosamiento de la piel (Anderson, Fuglsang y Zubaidy, 1973); y (b) **la generalizada**, cuya expresión incluye prurito diseminado, diferentes tipos de dermatitis, nódulos subcutáneos, linfoedema, linfo adenopatías, lesiones oculares y lesiones de otros tejidos viscerales (Bartlett y col., 1978; Connor, 1974).

En la forma localizada existen pocas microfilarias en piel, y el examen histológico demuestra acantosis, hiperqueratosis e infiltrados celulares compuestos por abundantes células plasmáticas y escasos linfocitos e histiocitos (Ngu, 1978).

En la forma generalizada hay numerosas microfilarias en la piel, siendo variable el cuadro histológico, aunque siempre llama la atención la ausencia de lesiones inflamatorias alrededor de las microfilarias vivas, tanto en la piel como en los ojos (Henson, Mackenzie y Spector, 1979).

Algunos autores creen que esta diversidad de manifestaciones puede ser debida a las variaciones observadas en la patogenicidad de distintas cepas de 0. volvulus (Duke y Anderson, 1972; Bryceson y col., 1976). En contraste con ello, otros autores han sostenido que estas diferencias clínico-patológicas son consecuencia de respuestas inmunológicas heterogéneas por parte del hospedero (Ngu, 1978; Ngu y Blackett, 1976). Todavía es temprano para resolver esta controversia, pero la información obtenida durante la última década confirma la existencia de diferentes patrones de respuesta inmunológica en las distintas formas clínico-patológicas de la enfermedad (Buttner y col. 1982).

4.1. Respuesta mediada por linfocitos T

La inmunidad mediada por linfocitos T ha sido estudiada a través de pruebas cutáneas hechas con antígenos homólogos (de diferentes estadios de **O. volvulus**) y con antígenos heterólogos (de otros nemátodos, en particular Ascaris y Necator), así como mediante técnicas que revelan **in vitro** diferentes productos de la activación de los linfocitos (Bartlett y col., 1978; Connor, 1974; Ngu, 1978).

Esos estudios han demostrado que la hipersensibilidad cutánea retardada (tipo IV de Coombs y Gell, 1968) aparece en las formas localizadas de la oncocercosis, estando frecuentemente deprimida en las formas generalizadas de la enfermedad. Se ha postulado que esta depresión de la inmunidad mediada por linfocitos T puede ser debida a la interacción de anticuerpos, antígenos o complejos inmunológicos circulantes con las células inmunocompetentes del hospedero (Ngu, 1978). Greene, Fanning y Ellner (1983), por su parte, han- demostrado que la depresión de la reactividad linfocitaria se manifiesta ante antígenos homólogos y heterólogos, sosteniendo que el mecanismo depresor debe ser distinto para cada uno de esos grupos de antígenos. Recientemente, nuestro grupo ha revelado que existe correlación positiva entre la presencia de antígenos circulantes y la depresión de la hipersensibilidad cutánea retardada (Arango y col. 1983). Los antígenos detectados en circulación pueden estar libres o asociados con anticuerpos; pudiendo ejercer acciones supresoras directamente, bloqueando receptores de superficie de linfocitos efectores, o indirectamente, a través de la estimulación de células supresoras. Por otra parte, investigaciones conjuntas con el equipo del Centro Nacional de Referencia en Inmunología Clínica de Caracas, han demostrado que los linfocitos de pacientes oncocercosos inmunodeprimidos proliferan normalmente **in vitro** cuando se les estimula con fitohemaglutinina, en presencia de suero humano normal y después de precultivarlos durante 18 horas (Pérez-Rojas y col., 1983). Sin embargo, cuando la estimulación se hace en presencia de suero autólogo se observa inhibición de la proliferación en 58% y estimulación en 26% de los casos.

Por otra parte, el suero autólogo deprimió la respuesta proliferativa de los linfocitos precultivados cuando se les estimuló con aloantígenos en cultivo mixto de linfocitos, y en el sobrenadante de los medios de precultivo se reveló la presencia de complejos inmunológicos (Pérez-Rojas y col., 1983).

Las observaciones precedentes sugieren que en pacientes con formas generalizadas severas de oncocercosis existen factores séricos (anticuerpos, antígenos y/o inmunocomplejos) que bloquean las funciones de los linfocitos T a nivel central y/o periférico. Esto se manifiesta in vivo por una depresión de la hipersensibilidad cutánea retardada, e in vitro por una disminución de la capacidad proliferativa de los linfocitos en respuesta a mitógenos, antígenos parasitarios y aloantígenos. La recuperación de esa capacidad después del precultivo indica que la depresión es adquirida y sugiere que uno de los mecanismos que la provocan es la obstrucción de los receptores superficiales de los linfocitos.

4.2. Respuesta mediada por linfocitos B

La infección por 0. volvulus estimula la síntesis de anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos de los diferentes estadios que entran en contacto con el sistema inmunológico del hospedero definitivo (larvas L3, filarias adultas y microfilarias). Esos anticuerpos pertenecen fundamentalmente a las clases IgG, IgM e IgE de las inmunoglobulinas (Ngu y Blackett, 1976; Weiss, Hussain y Ottesen, 1982). Las concentraciones séricas de esos anticuerpos son mayores en pacientes portadores de formas generalizadas de oncocercosis que en aquellos con formas localizadas de la infección (Ngu y Blackett, 1976). En áreas endémicas del Africa se ha observado que los niveles de IgG y de IgM correlacionan directamente con la carga parasitaria y la microfilaruria (Buck y col., 1971). Ngu y Blackett (1976) han demostrado la formación de conglutininas, postulando que esos anticuerpos, dirigidos contra ciertos componentes del complemento, pueden intervenir en la patogenia de la oncocercosis. Las mayores concentraciones de conglutininas se observaron en pacientes con formas localizadas de la afección, las cuales como anotamos anteriormente, exhiben una inmunidad celular conservada. Tomando en cuenta observaciones que demuestran la participación de las inmunoconglutininas en la eliminación de inmunocomplejos circulantes, Ngu y Blackett sugirieron que a través de ese mecanismo tales anticuerpos deben aumentar la resistencia del hospedero contra **O. volvulus.**

4.3. Papel de los granulocitos

Los granulocitos periféricos intervienen activamente en la respuesta del huésped vertebrado frente a infecciones causadas por bacterias y hongos.

Para cumplir con su misión fagocitaria deben desplazarse hacia el microorganismo invasor, adherirse a él, e incorporarlo a su citoplasma y digerirlo o provocar su muerte por lisis.

En el caso de la oncocercosis se ha observado que los granulocitos neutrófilos y eosinófilos se movilizan activamente hacia las microfilarias de **0. volvulus** cuando se les incuba en presencia de suero inmune y suero fresco. (King, Spagnuolo y Greene, 1983). Estos autores presumen que el mecanismo de atracción es la activación del complemento por anticuerpos termoestables que se adhieren a la superficie de las microfilarias. Anteriormente se había demostrado, por una parte, la presencia de inmunoglobulinas sobre la superficie de microfilarias de **0. volvulus** provenientes de la piel de individuos oncocercosos (Greene y col., 1981; Ngu y Blackett, 1976; Lucasse, 1962) y, por otra, el consumo de complemento cuando las microfilarias se incuban en suero fresco combinado con suero inmune (King, Spagnuolo y Greene, 1983). Estos autores postulan que la unión de anticuerpos a la superficie de las microfilarias provoca la activación del complemento llevando a la generación de factores quimiotácticos (probablemente C5a o C567).

Con respecto a las interacciones de los polimorfonucleares con las microfilarias de **0. volvulus**, se ha demostrado que los granulocitos de individuos oncocercosos o normales, adhieren a los parásitos y provocan su muerte por mecanismos de citotoxicidad dependientes de la presencia de anticuerpos y complemento (Greene, Taylor y Aikawa, 1981).

Tanto la quimiotaxis de los granulocitos de pacientes oncocercosos como su actividad citotóxica dependiente de anticuerpos frente a microfilarias de **0. volvulus,** han sido confirmadas en nuestro Laboratorio (Allan y col., datos no publicados). Adicionalmente nuestro grupo ha observado que la locomoción de los granulocitos es inhibida por la incorporación al medio de antígenos de **O. volvulus** y suero de oncocercosos, lo que sugiere una supresión de la función leucocitaria debida a la formación de inmunocomplejos.

5. INMUNOPATOLOGIA

La respuesta inmunológica del ser humano infectado por **O. volvulus** parece ser la causa principal de la mayoría de las lesiones características de la oncocercosis (Henson, Mackenzie y Spector, 1979). Por una parte se han observado reacciones de hipersensibilidad provocadas por microfilarias muertas (Bryceson, 1976; Guerra-Cáceres y col, 1980), y por otra, se sospecha que la depresión de la respuesta mediada por células T podría ser causa de la natura-

leza crónica de la infección y de algunas de las lesiones de tipo degenerativo debidas a la prolongada presencia del parásito en el hospedero.

5.1. Hipersensibilidad inmediata (Tipo I de Coombs y Gell, 1968)

En la oncocercosis el conflicto inmunológico comienza en el momento en que la larva infectante (L3) es introducida a través de la piel del hospedero durante la picadura del vector. Esa larva posee en su superficie antígenos propios y, probablemente, inmunógenos provenientes del simúlido en el cual se desarrolló. Es posible que tales antígenos estimulen la síntesis de diversos tipos de anticuerpos algunos de los cuales podrían pertenecer a la clase IgE. .Esos anticuerpos, al interactuar con nuevas dosis de antígenos pueden ser responsables de algunas de las reacciones de hipersensibilidad cutánea inmediata que se observan en individuos ubicados en áreas endémicas, minutos después de ser picados por simúlidos (Ramírez-Pérez, Yarzábal y Peterson, 1982; Lacey, 1981).

Posteriormente, una vez que las filarias adultas se han desarrollado y fecundado en los tejidos subcutáneos, aparecen las microfilarias en diferentes tejidos del hospedador. Se piensa que estas larvas son las responsables de las lesiones cutáneas y oculares de la oncocercosis (Henson, Mackenzie y Spector, 1979). De acuerdo con la hipótesis más aceptada, esas lesiones son el resultado de la inflamación provocada por reacciones de hipersensibilidad inmediata debidas a la liberación de antígenos causada por la muerte de las microfilarias (Bryceson, 1976). La interacción de esos antígenos con anticuerpos preformados de la clase IgE provoca la degranulación de mastocitos, la liberación de aminas vasoactivas, la aparición de anafilaxia local o sistemática y la formación de lesiones inflamatorias. Repitiéndose constantemente en el curso de la enfermedad estos fenómenos producirían las alteraciones anatómicas y funcionales observadas en la piel y en los ojos de los oncocercosos (Henson, Mackenzie y Spector, 1979). Reacciones similares constituyen la base fisiopatológica de los accidentes que ocurren después del tratamiento con dietilcarbamazina (Bryceson, 1976; Bryceson, Warrell y Pope, 1977; Guerra-Cáceres y col., 1980). Esta droga promueve in vitro la movilización y la muerte de las microfilarias de 0. volvulus, causando reacciones anafilácticas generalmente localizadas a la piel y los ojos (reacción de Mazzotti). Sin embargo, en pacientes portadores de elevadas cargas parasitarias la reacción se generaliza y puede resultar fatal (Bryceson, Warrell y Pope, 1977). Las reacciones localizadas se manifiestan entre los 15 minutos y las 12 horas después de la administración oral de 50-100 mg de dietilcarbamazina. Se caracterizan por la intensificación de síntomas pre-existentes (prurito de piel y ojos, dolor ocular, fotofobia, lacrimeo e inflamación cutánea y conjuntival). Esta sintomatología puede ser se-

guida de una erupción generalizada acompañada de sensación de quemadura de la piel. Los ganglios linfáticos que drenan las áreas afectadas se vuelven blandos, suaves y dolorosos. En los pacientes con microfilarias en la cámara anterior del ojo aparece hiperemia conjuntival, fotofobia y, ocasionalmente, iridociclitis aguda. También ocurren lesiones en la cámara posterior del ojo, las cuales, aunque no se manifiestan de inmediato al examen clínico, pueden ser demostradas más tardíamente mediante angiografía fluorescente. Las reacciones generalizadas tienen un comienzo similar, pero se acompañan de disturbios sistémicos (escalofríos, insomnio, sudor, tos y síncope). Adicionalmente el paciente presenta fiebre, taquipnea, taquicardia, hipertensión y cambios hematológicos: eosinofilia, neutrofilia, linfocitopenia y monocitopenia. Estas reacciones son responsables de los accidentes fatales comunicados en la literatura (Bryceson, Warrell y Pope, 1977).

5.2 Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos (Tipo III de Coombs y Gell, 1968)

Esta forma de hipersensibilidad (tipo Arthus) ha sido bien documentada por Ngu (1978) en la oncocercosis. El fenómeno se vuelve evidente alrededor de 6 horas después de la inyección intradérmica de antígenos de O. volvulus, desapareciendo entre las 24 y las 36 horas. Se caracteriza clínicamente por infiltración difusa y eritematosa de la piel, e histológicamente por edema e infiltrados celulares a predominio polimorfonuclear. La forma generalizada, comparable a la enfermedad del suero, no ha sido demostrada en esta enfermedad, pero se ha sugerido que un mecanismo similar podría explicar la vasculitis retiniana, la atrofia óptica, la uveítis y los infiltrados perivasculares de polimorfonucleares que se observan en la oncocercosis.

5.3. Patología causada por inmunocomplejos circulantes

Varios estudios han puesto de manifiesto la presencia de inmunocomplejos en el suero de pacientes oncocercosos (Steward y col., 1982; Greene y col., 1980; Guerra-Cáceres y col. 1980; Paganelli, Ngu y Levinsky, 1980). Su prevalencia y sus concentraciones séricas varían en relación con la técnica utilizada para demostrarlos (Steward y col., 1982). Todavía no ha sido posible identificar el (o los) antígeno (s) parasitarios (s) que los conforman y no se ha encontrado correlación entre sus niveles y la carga parasitaria o los títulos de anticuerpos anti- **0. volvulus**. Sin embargo nuestro grupo ha encontrado indicios de que los inmunocomplejos actúan como moduladores de la respuesta inmunológica en la oncocercosis y que su interacción con distintas subpoblaciones linfocitarias (células supresoras o efectoras) puede causar la depresión de la respuesta T observada en formas generalizadas de la enfermedad (Yarzábal y col., 1983). Por otra parte, Greene y col. (1983), han observado que los onco-

cercosos portadores de complejos inmunológicos circulantes desarrollan lesiones sistemáticas y oculares con frecuencia significativamente mayor que los no portadores, cuando son tratados con dietilcarbomazina. Esto demuestra que los complejos inmunológicos tienen importante participación en la patogenia de la enfermedad.

5.4. Alteraciones debidas a antígenos circulantes

Recientemente se ha demostrado que el suero de pacientes con oncocercosis puede contener antígenos solubles de **0. volvulus** (Ouaissi y col., 1981; des Moutis y col, 1983). La especificidad parasitaria de esos antígenos ha sido probada mediante reacciones de identidad inmunológica entre las sustancias del suero y extractos solubles del estadio adulto de **O. volvulus**. Aparentemente no existe correlación entre el número de microfilarias en la piel y la concentración sérica de los antígenos. Sin embargo, en nuestro Laboratorio hemos observado que la antigenemia se asocia con la depresión de la hipersensibilidad cutánea retardada (Arango y col., 1983). Esto nos lleva a pensar que los antígenos circulantes de **O. volvulus,** aislados o asociados con anticuerpos, intervienen en la modulación de la respuesta T, actuando a nivel de los receptores de superficie de los linfocitos efectores o a través de la estimulación de células supresoras.

6. INMUNODIAGNOSTICO

El inmunodiagnóstico de la oncocercosis ha sido objeto de numerosos trabajos y de varias revisiones (Biguet y col, 1966; Capron, Gentilini y Vernes, 1968; Ambroise-Thomas y Kien Truong 1974; Kagan, 1979). Para realizarlo se han empleado diversos preparados antigénicos y prácticamente todas las técnicas que exploran la respuesta inmunológica. Las sustancias utilizadas más frecuentemente como antígenos han sido preparados heterólogos derivados de helmintos distintos de **0. volvulus** pero más fáciles de obtener en los laboratorios (Ambroise-Thomas y Kien TZruong, 1974; Kouemeni y col., 1982; Klenk y col., 1983; Ouaissi y col., 1983). Esto ha producido altos índices de inespecificidad en las diferentes pruebas, limitando de ese modo la generalización de su aplicación tanto al diagnóstico de casos, como al control del tratamiento o al estudio epidemiológico de poblaciones.

Sin embargo, la introducción de procedimientos de crioconservación para mantener viables a las microfilarias (Schiller y col., 1979); la obtención de medios especiales para la preparación de extractos de excreción-secreción (Ngu y col., 1981); y la adaptación de una técnica de digestión enzimática para la separación de filarias adultas (Schulz-Key, Albiez y Buttner 1977); han hecho posible la preparación de antígenos homólogos, facilitando de ese modo

el empleo de técnicas muy sensibles como los ensayos inmunoenzimáticos o radioinmunológicos. Como no es propósito de esta revisión el hacer un análisis exhaustivo de todo el tema, nos limitaremos a discutir brevemente las técnicas inmunológicas que consideramos de mayor utilidad en el momento actual para el diagnóstico de la oncocercosis.

6.1. Pruebas cutáneas

El uso de antígenos obtenidos de microfilarias de **0. volvulus** ha mejorado significativamente la especificidad de las pruebas cutáneas, especialmente en encuestas epidemiológicas (Ulrich, Pinardi y Convit, 1972; Hashiguchi y col., 1979). Estos autores, empleando extractos solubles crudos en la intradermo-reacción obtuvieron resultados positivos en 85-86% de los pacientes con oncocercosis, y observaron falsos positivos en 7-13% de los individuos portadores de otras helmintiasis. El uso de productos de excreción-secreción en la misma prueba genera una positividad del 80-100% manteniendo bajos índices de inespecificidad (Schiller, D'Antonio y Figueroa, 1980). Ngu y col. (1981) comunicaron que la técnica de punciones múltiples se adapta éxitosamente a la exploración de la reactividad cutánea en la oncocercosis. Mediante esa prueba lograron reacciones positivas en 81% de los pacientes con microfilarias en piel, mientras que obtuvieron falsos positivos en 13.5% de los casos de ascariasis, 4,5% de los individuos con loiasis y 2.4% de personas clínicamente normales. Estos hallazgos indican que las pruebas cutáneas con antígenos de microfilarias de O. volvulus pueden ser de utilidad para el diagnóstico de la oncocercosis a escala epidemiológica.

6.2. Pruebas de inmunoprecipitación

La aplicación mayor de estas pruebas en la oncocercosis ha tenido lugar en el análisis inmunológico de extractos solubles de **0. volvulus** (Biguet y col., 1962; Biguet y col., 1964; Capron, Gentilini y Vernes, 1968). El estudio de esos extractos mediante la inmunoelectroforesis ha permitido individualizar sistemas precipitantes características de la enfermedad, cuya formación por medio del suero de un enfermo permite formular un diagnóstico preciso. En manos de los investigadores del grupo de Lille esta técnica es usada para revelar anticuerpos de valor diagnóstico aún con antígenos heterólogos, como los extractos solubles de **Dipetalonema viteae** una filaria que se mantiene sin grandes dificultades en el criceto (Biguet y col., 1964; Capron, Gentilini y Vernes, 1968). Empleando antígenos homólogos estos autores han revelado anticuerpos en 89% de los casos de oncocercosis; mientras que con antígenos heterólogos han alcanzado una sensibilidad del 87%. En los inmunoelectroforegramas obtenidos con antígenos homólogos se forman arcos de precipitación que aseguran el diagnóstico de oncocercosis, permitiendo el diagnóstico diferencial con otras filariasis.

6.3. Inmunofluorescencia

Ambroise-Thomas y Kien Truong (1974) han revisado exhaustivamente el uso de la inmunofluorescencia en las filariasis, incluyendo la oncocercosis. La principal ventaja de este procedimiento es la escasa cantidad de antígeno que requiere, puesto que bastan unas pocas filarias adultas para realizar miles de pruebas. Como en el caso de la inmunoprecipitación se puede recurrir a preparados antigénicos de **D. viteae** pero el uso de **O. volvulus** incrementa significativamente la sensibilidad y la especificidad de la técnica. El estudio de sueros de personas radicadas en áreas de hipo, meso e hiperendemia oncocercósica ha demostrado que la inmunofluorescencia es capaz de discriminar esos distintos niveles de infección. Su uso en encuestas seroepidemiológicas es facilitado debido a que puede ser efectuado en pequeñas cantidades de sangre recogidas en papel de filtro.

6.4. Hemaglutinación indirecta

Esta técnica también ha sido adaptada al estudio de la oncocercosis. De igual modo que la inmunofluorescencia, se puede realizar con muestras de sangre obtenidas por punción auricular y recogidas en papel de filtro. (Ikeda, Tada y Aoki, 1978). Con este método Ikeda y col. (1979) han obtenido resultados positivos en 95% de los pacientes con microfilarias en piel, en 82% de individuos portadores de nódulos y en 22.5% de los habitantes de áreas endémicas negativos para nódulos y microfilarias. Contrariamente, en regiones libres de la oncocercosis la prueba sólo generó 3.0 - 3.5 por ciento de reacciones positivas. Ikeda y col. (1979) piensan que la alta reactividad observada en personas clínicamente normales de áreas endémicas es debida a la existencia de individuos con infecciones pre-patentes.

6.5. Ensayo inmunoenzimático

Bartlett, Bidwell y Voller (1975) fueron los primeros en aplicar la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) al diagnóstico de la oncocercosis. Sus resultados fueron decepcionantes porque el antígeno de **0. volvulus** empleado dio valores muy altos de densidad óptica no sólo al ser incubado con un suero positivo, sino también al interactuar con la solución salina amortiguadora en ausencia de anticuerpos. Los autores consideraron que esta reactividad fue debida a la presencia de inmunoglobulinas humanas en el preparado antigénico, las cuales reaccionaron con el conjugado anti-inmunoglobulinas humanas marcado con la enzima. Tomando en cuenta esta observación Ambroise-Thomas, Daveau y Desgeorges (1980) re-evaluaron la técnica, utilizando un antígeno purificado. Para determinar el valor diagnóstico de la ELISA examinaron comparativamente con la inmunofluorescencia 90 sueros de

pacientes con oncocercosis y 230 sueros de individuos clínicamente normales residentes en el área endémica. La ELISA mostró una sensibilidad similar a la de la inmunofluorescencia (80%) en el grupo de pacientes, pero exhibió menor reactividad entre los residentes del área endémica.

Posteriormente Ambroise-Thomas y Daveau (1981) informaron que la prueba aumenta significativamente su especificidad cuando se usan productos de excreción-secreción de **0. volvulus** adultos como antígeno. Nuestro grupo (Yarzábal y col., datos no publicados) ha confirmado la utilidad diagnóstica de la prueba, demostrando que cuando se usa la determinación de un título como criterio diagnóstico es capaz de discriminar la oncocercosis de filariasis tan afines como la mansonelosis.

6.6. Radioinmunoensayo

A partir de la segunda mitad de la década de los años setenta se han comenzado a aplicar procedimientos de radioinmunoensayo a la búsqueda de anticuerpos en la oncocercosis. Se han utilizado básicamente dos procedimientos, uno que emplea papel de filtro como soporte para el antígeno (Somorin y Heiner, 1976), y otro que utiliza esferas de agarosa con el mismo fin (Weiss, Speiser y Hussain, 1981). Con este último procedimiento Weiss, Hussain y Ottesen (1982) han demostrado que los anticuerpos de la clase IgE exhiben menos reactividad cruzada que los correspondientes a la IgC. Según Weiss, Speiser y Hussain (1981) la sensibilidad del RAST con antígenos solubles del estadio adulto de **0. volvulus** alcanza a 96%, mientras que cuando la misma prueba se efectúa con antígenos heterólogos la variable mencionada desciende (89% con **D. viteae** y 54% con **Dirofilaria immitis**).

7. RESUMEN

La aplicación de los métodos y los conceptos de la inmunología al estudio de la oncocercosis ha provocado notables progresos en la comprensión de ciertos aspectos de las relaciones entre el agente causal (**0. volvulus**) y su hospedero definitivo natural (**Homo sapiens**).

El análisis inmunoquímico del parásito ha demostrado que se trata de un organismo antigénicamente muy complejo, que posee una gran cantidad de inmunógenos, entre los cuales se han identificado sustancias características de estadio y de especie, así como moléculas antigénicas compartidas con otros parásitos o con el propio hospedero.

El estudio de la respuesta inmunológica de los individuos infectados ha confirmado que la oncocercosis es una enfermedad espectral, en la cual se observan formas localizadas, autolimitadas, donde la capacidad inmunológica

está íntegramente conservada, y formas generalizadas, progresivas, que muestran franca depresión de la inmunidad celular.

La búsqueda de los mecanismos responsables de este desequilibrio en la respuesta inmunológica ha revelado que en un número significativo de pacientes inmunodeprimidos existen factores inmunomoduladores (antígenos e inmunocomplejos), y ha sugerido que esas sustancias pueden provocar depresión de la respuesta T a través de su interacción con distintas subpoblaciones linfocitarias.
Con respecto a la inmunopatología se ha confirmado la intervención de reacciones de hipersensibilidad en la patogenia de las lesiones dérmicas y oculares de la oncocercosis, y se ha postulado que la depresión de la respuesta mediada por células T podría ser causa de la naturaleza crónica de la infección y de algunas lesiones de tipo degenerativo.

Finalmente, con respecto al inmunodiagnóstico, el uso creciente de antígenos homólogos, parcialmente purificados, y la introducción de técnicas sumamente sensibles como los ensayos inmunoenzimático y radioinmunológico, provocaron significativo aumento de la sensibilidad y la especialidad de las pruebas intradérmicas y serológicas. Entre éstas adquirió particular valor el ensayo inmunoenzimático (ELISA) debido a su bajo consumo de reactivos, su objetividad, sus buenos índices de sensibilidad y especificidad, y su adaptabilidad para el estudio de poblaciones.

8. AGRADECIMIENTO

Las investigaciones sobre oncocercosis realizadas en nuestros laboratorios son financiadas por el CONICIT (Proyecto S1-1128), la Universidad Central de Venezuela, el PROICET AMAZONAS, el Ministerio de la Investigación y la Industria de Francia (Subvención 81-L-0013) y el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (Proyecto PNUD VEN/82/006).

BIBLIOGRAFIA

Ambroise-Thomas, P. Immunological diagnosis of human filariases: present possibilities, difficulties and limitations. Acta Tropica, 31:108,1974.
Ambroise-Thomas, P. & Daveau, C. Acquisitions recentes et orientations actuelles de l'immunologie des filarioses. Ann. Soc, beige Med. Trop., 61:311, 1981.
Ambroise-Thomas, P.; Daveau, C. & Desgeorges, P.T. Sérodiagnostic de l'onchocercose par micro-ELISA. Etude de 450 sérums et comparaison avec l'immunofluorescence indirecte. Bull. Soc. Path. exot., 73:430, 1980.
Ambroise-Thomas, P. & Kien Truong, T. Application of the indirect fluorescent antibody test on sections of adult filariae to the serodiagnosis, epidemiology and post-therapeutic surveillance of human filariasis. Ann. Trop. Med. Parasit., 68:435, 1974.
Anderson, J.; Fuglsang, H.; Hamilton, P.J.S. & Marshall, T.E.C. Studies on onchocerciasis in the United Cameroon Republic. I. Comparison of population with and without Onchocerca volvulus. Trans. Roy, Soc. Trop. Med. Hyg., 68:190, 1974.
Anderson, J.; Fuglsang, H. & Zubaidy, A. Onchocerciasis in Yemen with special reference to sowda. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 67:30, 1973.
Arango, M.; Lugo, E.; Ouaissi, A.; Des Moutis, I.; Capron, A & Yarzábal, L. Asociación de antigenemia con depresión de la hipersensibilidad cutánea retardada en la oncocercosis. In: Filariasis humanas en el

Territorio Federal Amazonas (Venezuela), Ed. PROICET AMAZONAS, Caracas, Pub. Cient. N° 2:101, 1983.
Arzube, M.E.; Rumbea, J.; Lazo, R.F. & Cedeño, J.U. Primer foco de oncocercosis descubierto en Ecuador. Bol. Epid. OPS, 2:4, 1981.
Bartlett, A.; Bidwell, D.E. & Voller, A. Preliminary studies on the application of enzyme immunoassay in the detection of antibodies in onchocerciasis. Tropenmed. Parasit., 26:370, 1975. Bartlett, A.; Turck, J.; Ngu, J.; Mackenzie, C.D.; Fuglsang, H. & Anderson, J. Variation in delayed hypersensitivity in onchocerciasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72:372, 1978. Blaklock, D.B. The development of Onchocerca volvulus in Simulium damnosum. Ann. Trop. Med. Parasit., 20:1, 1926.
Biguet, J.; D'Haussy, R.; Aubry, M. & Rosé, F. Etude des anticorps précipitants chez les sujets atteints d'onchocercose. Bull. Soc. Path. Exot., 57:1098, 1964.
Biguet, J.; D'Haussy, R.; Capron, A.; Tran Van Ky, p. & Aubry, M. Les antigenes d'Onchocerca volvulus. I Etude immunoéléctrophoretique préliminaire. Bull. Soc. Path. Exot., 8:845, 1962. Brown, H & Bernton, H.S. A case of asthma caused by Simulium jenningsi (Order Diptera) protected by hiposensitization. J. Allergy, 45:103, 1970.
Bryceson, A.D.M. What happens when microfilariae die? Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 70:397, 1976.
Bryceson, A.A.M.: Van Veen, K.S.; Oduloju, A.J. & Duke, B.O.L. Antigenic diversity among Onchocerca volvulus in Nigeria, and immunological differences between onchocerciasis in the savanna and forest of Cameroon. Clin. exp. Immunol., 24:168, 1976. Bryceson, A.D.M.; Warrell, D.A. & Pope, H.M. Dangerous reactions to treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine. Brit. Med. J., 1:742, 1977.
Buck, A.A.; Anderson, R.I.; Colston, J.A.C.; Wallace, C.K.; Connor, D.H.; Harman, L.E.; Donner, M.W. & Ganley, J.P. Mlcrofilaruria in onchocerciasis. Bull. WHO, 45:353, 1971.
Buttner, D.W.; von Leer, G.; Mannweiler, E. & Buttner, M. Clinical parasitological and serological studies on onchocerciasis in the Yemen Arab Republic. Tropenmed. Parasitol., 33:201, 1982. Capron, A.; Gentilini, M. & Vernes, A. Le diagnostic immunologique des filarioses. Possibilités nouvelles offertes par l'immunoélectrophorese. Path. Biol., 16:1039, 1968.
Collins, W.E. & Skinner, J.C. The use of fixed tissue sections to determine antibodies to Onchocerca volvulus in a fluorescent antibody test. J. Parasit., 65:827, 1979. Connor, D.N. Onchocerciasis - symptomatology, pathology, diagnosis. Ed. by A. Buck, pp. 10-14, WHO, Geneva, 1974.
Coombs, R.R.A. & Gell, P.G.H. Clinical aspects of immunology. Ed. P.G.H. Gell & R.R.A. Coombs, 2nd. ed., F.A. Davis Company, Philadelphia, 1968.
De León, R.J. & Duke, B.O.L. Experimental studies on the transmission of Guatemalan and West African strains of Onchocerca volvulus by Simulium ochraceum, S. metallicum and S. callidum. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60:735, 1966,
Des Moutis, I.; Ouaissi, A.; Grzych, J.M.: Yarzábal, L.; Haque, A. & Capron, A. Onchocerca volvulus: detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 32:533, 1983.
Duke, B.O.L. & Anderson, J. Comparison of the lesions produced in the cornea of the rabbit eye by microfilariae of the forest and Sudan-savanna strains of Onchocerca volvulus from Cameroon. I. The clinical picture. Tropenmed. Parasit., 23:354, 1972.
Fife, E.H. Advances in methodology for immunodiagnosis of parasitic diseases. Exp. Parasitol., 30:132, 1971.
Greene, B.M.; Fanning, M.M. & Ellner, J.J. Non-specific suppression of antigen-induced lymphocyte blastogenesis in Onchocerca volvulus infection in man. Clin. Exp. Immunol., 52:259, 1983. Greene, B.M.; Taylor, H.R. & Aikawa, M. Cellular killing of microfilarie of Onchocerca volvulus: eosinophil and neutrophil-mediated immune serumdependent destruction. J. Immunol., 127:1611, 1981.
Greene, B.M.; Taylor, H.R.; Humprey, R.L. & Lawley, T.J. Circulating immune complexes in onchocerciasis: significance and influence of' deithylcarbamazine therapy. Clin. Res., 28:370, 1983.

Guerra-Cáceres, J.G.; Bryceson, A.D.M.; Quakyl, I. & Siry, C.J.F. Studies on the mechanisms of adverse reactions produced by diethylcarbamazine in patients with onchocerciasis: Mazzotti reaction. Parasit. Immunol, 2:121, 1980.
Hashiguchi, Y.; Kawabata, M.; Zee, G.; Recinos, M.J. & Flores, 0. The use of an Onchocerca volvulus microfilarial skin test in an epidemiological survey of onchocerciasis in Guatemala. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 73:543, 1979.
Henson, P.M.; Mackenzie, C.D. & Spector, W.G. Inflamatory reactions in onchocerciasis: a report of current knowledge and recommendations for further studies. Bull. WHO, 57:667, 1979. Hoffmann, C.C. Estudios entomológicos y parasitológicos acerca de la oncocercosis en Chiapas, Salubridad (México), 1:669, 1930.
Ikeda, T.; Aoki, Y.; Tada, I; Recinos, M.; Ochoa, J. & Molina, P.A sero-epidemiological study of onchocerciasis with the indirect hemagglutination test. J. Parasitol., 65:855, 1979. Ikeda, T.; Tada, I. & Aoki, Y. The indirect hemagglutination test for onchocerciasis performed with blood collected on filter paper. J. Parasitol., 64:786, 1978. Ishii, A. Antigenicity of excretory and secretory products of the cotton rat filaria, Litomosoides carinii. Jap. J. Exp. Med., 40:39, 1970.
Janssens, P.G. Onchocerques et onchocercoses. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 61:155, 1981. Kagan, LG. Diagnostic, epidemiologic and experimental parasitology: immunological aspects. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28:429, 1979.
King, C.H.; Spagnuolo, P.J. & Greene, B.M. Chemotaxis of human granulocytes toward microfilariae of Onchocerca volvulus. Parasite Immunology, 5:217, 1983.
Klenk, A.; Geyer, E.; Zahner, H. Trojan, H. Isolation of antigen from Litomosoides carinii macrofilariae detecting serum antibodies to Onchocerca volvulus. Z. Parasitenkd., 69:377, 1983. Kouemeni, L.E.; Haque, A. & Capron, A. Detection of IgE antibodies in onchocerciasis. Possibility of using allergens of Dipetalonema viteae extracts that cross-react with allergenic determinants in crude extracts of Onchocerca volvulus. Clin. Exp. Immunol., 50:541, 1982. Lacey, L.A. Simulideos antropofilicos no Parque Nacional da Amazonia (Tapajos), Brasil, com referencia aos efeitos no homem. Bol Of. San. Panam., 90:326, 1981.
Little, M.D. & D'Alessandro, A. Onchocerciasis in Colombia. Parasitologic findings in the first observed focus. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19:831, 1970.
Lucasse, C. Fluorescence antibody test for onchocerciasis. Zeit. tropenmed. Parasit., 13:404, 1962.
Marcoullis, G.; Salonen, E.M. & Grasbeck, R. Sequential affinity chromatography for the purification of antigens extracted from Onchocerca volvulus adult worms. Tropenmed. Parasit., 29:39, 1978.
Moraes, M.A.P.: Fraiha, H. & Chaves, G.M. Oncocercose no Brasil, Bol. Of. Sanit. Panam., 76:48, 1974.
Nelson, G.S. Onchocerciasis. In: Advances in Parasitology, 8:173, 1970.
Nelson, G.S. Issues in filariasis. A century of enquiry and a century of failure. Acta Tropica, 38:197, 1981.
Neppert, J. Cross-reacting antigens among some Filariae and other Nematodes. Tropenmed. Parasit., 25:454, 1974.
Ngu, J. Immunological studies on onchocerciasis. Varying skin hypersensitivity and leucocyte migration in a clinical spectrum of the disease. Acta tropica, 35:269, 1978. Ngu, J.L. & Blackett, K. Immunological studies in onchocerciasis in Cameroon. Trop. Geogr. Med., 28:111, 1976.
Ngu, J.L.; Ndumbe, P.M.: Titanji, V. & Leke, R. A diagnostic skin test for Onchocerca volvulus infection. Tropenmed. Parasit., 31:165, 1981.
Ngu, J.L.; Neba, G.A.; Leke, R.; Titanji, V.; Asoganyi, T. & Ndumbe, P. Selective recovery of living microfilariae from Onchocerca volvulus nodules. Acta Tropica, 38:261, 1981. Noble, J.; Valverde, L.; Egufa, O.E.; Serrate, 0. & Antezana, E. Hemorragic exanthem of Bolivia. Studies of an unusual hemorragic disease in high altitude dwellers at sea level. Am. J. Trop. Med. Hyg., 99:123, 1974.
Ouaissi, A; des Moutis, I.; Cornette, J.; Pierre, R. & Capron, A. Detection of IgE antibodies in onchocerciasis using a semipurified fraction of Dipetalonema viteae total antigen. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 70:231, 1983.
Ouaissi, A.; Kouemeni, L.E.; Haque, A; Ridel, P.R.; André, P.S.A. . Capron, A. Detection of circulating antigens in onchocerciasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30:1211, 1981. Paganelli, R.; Ngu, J. & Levinsky, R.J. Circulating immune complexes in onchocerciasis. Clin. exp. Immunol., 39:570, 1980.
Pérez-Rojas, G.E.; Valderrama, M.; Anderson, C.; Machado, I.; Bianco, N. & Yarzábal, L. Inmunidad mediada por células en la oncocercosis. Modificaciones por factores séricos. Comunicación preliminar. In: Filariasis humanas en el Territorio Federal Amazonas (Venezuela), Ed. PROICET AMAZONAS, Caracas, Publ. Cient. N° 2:93, 1983.
Pinheiro, F.P.; Bensabath, G.; Costa, D.; Maroja, D.M.; Linz, Z.C. & Andrade, A.H.R. Haemorragic syndrome of Altamira. Lancet, 1:639, 1974.

Potenza, L.; Febres Cordero, R. & Anduze, P.T. Nuevo foco endémico de oncocercosis en el mundo. Bol. Méd. Caracas, 1:263, 1949.
Railliet, A. & Henry, A. Les onchocerques, Nématodes parasites du tissu conjonctif. C.R. Soc. Biol. (Paris), 58:248, 1910.
Ramírez-Pérez, J.; Yarzábal, L. & Peterson, B. La simuliofauna del Territorio Federal Amazonas (Venezuela). Ed. PROICET AMAZONAS, Publ. Cient. N° 1, pp. 13-15, 1982.
Robles, R. Onchocercose humaine au Guatemala produisant la cécité et 1'érisipele su litoral. Bull. Soc. Path. Exot., 12:173, 1970.
Schiller, E.; D'Antonio, R. & Figueroa, H. Intradermal reactivity of excretory and secretory products of Onchocercal microfilariae. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29:1215, 1980. Schiller, E.; Turner, V.M.; Figueroa, H. & D'Antonio, R. The cryopreservation and in vitro cultivation of larval Onchocerca volvulus. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28:977, 1979.
Schulz-Key, H. Albiez, E. J. & Buttener, D.W. Isolation of adults Onchocerca volvulus from nodules. Tropenmed. Parasit., 21:428, 1977.
Steward, M.W.; Sisley, B.; Mackenzie, C.D. & El Sheik, H. Circulating antigen antibody complexes in onchocerciasis. Clin. exp. Immunol., 48:17, 1982.
Somorin, A.O. & Heiner, D.C. A new immunodiagnostic test in onchocerciasis. Clin. Allergy, 6:573, 1976.
Ulrich, M.; Pinardi, M.E. Convit, J. Immunological reactions on onchocerciasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 64:111, 1972.
Weiss, N.; Hussain, R. & Ottensen, E.A. IgE antibodies are more species specific than IgG antibodies in human onchocerciasis and lymphatic phylariasis. Immunology, 45:129, 1982.
Weiss, N.; Speiser, F. & Hussain, R. IgE antibodies in human onchocerciasis. Application of a newly developed radio-allergosorbent test (RAST). Acta Tropica, 38:353, 1981.
World Health Organization. Report of a WHO Expert Committee on epidemiology of Onchocerciasis. WHO Technical Report Seires N° 597, 1976.
Yarzábal, L.; Ramírez, R.; Pérez, R.; Arango, M. & Bianco, N. Alteraciones de la inmunidad humoral en la oncocercosis. In: Filariasis humanas en el Territorio Federal Amazonas (Venezuela). Ed. PROICET AMAZONAS, Caracas, Publ. Cient. N° 2:85, 1983.